

REC'D 03 JAN 2001

WIPO PCT

日本国特許庁

PATENT OFFICE

JAPANESE GOVERNMENT

4

JP00/7917

PCT/JP00/07917 3

10.11.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年11月11日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第321740号

出願人

Applicant(s):

山之内製薬株式会社

財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所



PRIORITY  
DOCUMENT

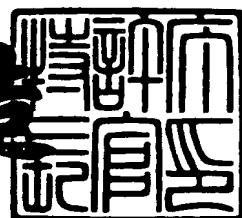
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2000年12月15日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3103522

【書類名】 特許願

【整理番号】 WP30552913

【提出日】 平成11年11月11日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 新規な金属プロテアーゼ

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

【氏名】 山地 昇

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

【氏名】 西村 耕一

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市請西2丁目20番25号

【氏名】 小原 収

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市清見台南5丁目1番26号 オータニガーデンハウスB-4

【氏名】 長瀬 隆弘

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市八幡台5丁目2番11号

【氏名】 野村 信夫

【特許出願人】

【識別番号】 000006677

【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 596175810

【氏名又は名称】 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

【識別番号】 100088616

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 一平

【電話番号】 03-5820-0535

【選任した代理人】

【識別番号】 100089200

【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

【識別番号】 100098501

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 拓

【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【電話番号】 03-5916-5111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009689

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704254

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な金属プロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ。

【請求項2】 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ。

【請求項3】 請求項1又は2記載の金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項4】 請求項3記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項5】 請求項4記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項6】 請求項5記載の宿主細胞を用いる請求項1又は2記載の金属プロテアーゼの製造方法。

【請求項7】 請求項1又は2記載の金属プロテアーゼに対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ADAMTS蛋白、該ADAMTS蛋白をコードする遺伝子、該ADAMTS蛋白の製造方法、該ADAMTS蛋白を用いたプロテアーゼ活性測定法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motif) は、Cys残基を多く含むディスインテグリン様ドメイン、金属プロテアーゼ様ド

メインおよびトロンボスponジンI型繰り返し配列（以下、TSP-1繰り返し配列という）を含む分子である。ADAMTS分子としてはプロコラーゲンI Nプロテイナーゼが古くより知られていたが、最近になり、マウスADAMTS-1が発見され（Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 273, 13912-13917, 1998）、分子群の存在が示唆された。1999年になるとADAMTS分子の遺伝子クローニングの報告が相次ぎ、現在までに、全長ヒト型全長ORF（翻訳領域）としては、マウスADAMTS-1のヒトオーソログと考えられるMET H-1（Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999）に加え、MET H2（Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999）、aggrecanas e-1（Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999）、ADAMTS11（aggrecanase-2）（Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999）、ADAMTS-6（Hurskainen T.L. et al., J. Biol. Chem., 274, 25555-25563, 1999）、ADAMTS-7（Hurskainen T.L. et al., J. Biol. Chem., 274, 25555-25563, 1999）が報告された。また、本発明者らのグループは、部分配列ではあるが、ADAMTS分子としてKIAA0366をデータベース登録している（Nagase T. et al., DNA Res., 4, 141-150, 1997; Tang, B. L. et al., FEBS Lett., 445, 223-225, 1999）。これらの分子は、ドメイン構造の違いのみならず、HExxH(HisG1uXaaXaaHis)からなる亜鉛結合コンセンサス配列を有する金属プロテアーゼ様ドメインの相同性という点でも、ADAMファミリーの中に独立したサブファミリーを構成している。これまでに報告されているADAMTS分子はいずれもプロペプチドと金属プロテアーゼ様ドメインとの間にfurinプロテアーゼの認識配列を有しており、現在までに組換え蛋白の発現が報告されている例では、同部位でプロペプチドが切断除去され、成熟蛋白となることが示されている（Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 273, 13912-13917, 1998; Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999; Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999; Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999）。

## 【0003】

ADAMTS分子の中で、プロコラーゲンI N-プロテイナーゼは、I型コラーゲンプロト体のN末端の切断除去酵素として、I型コラーゲンのプロト体から成熟型への転換

に関与し、コラーゲン線維の形成に重要な役割を果たしている。その遺伝子の異常とVIIC型Ehlers-Danlos症との関連性が示されている (Colige A. et al., Am. J. Hum. Genet., 65, 308-317, 1999)。aggrecanase-1 (ADAMTS4) およびADAMTS11 (aggrecanase-2) には、細胞外基質アグリカンをGlu373-Ala374の間で選択的に切断する活性が示され、関節炎や変形性関節症における軟骨細胞外基質アグリカンの分解の本体の酵素である可能性が示唆されている (Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999; Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999)。また、マウスADAMTS-1にも、広範囲なプロテアーゼと反応するアルファ2マクログロブリン (以下  $\alpha$  2M) との反応産物を生成することが報告され、蛋白分解活性を有することが示唆されている (Kuno K, et al., J. Biol. Chem., 274, 18821-18826, 1999)。この他の分子についても、今後、プロテアーゼ活性の有無が検討され、その活性と生理的意義の関連性が探られていくと考えられる。

#### 【0004】

一方、プロテアーゼ活性以外の機能に関する解析が行われている。ADAMTS分子であるMETH-1とMETH-2には強力な血管新生阻害活性があることが報告され (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-23357, 1999)、蛋白自体の癌治療領域での応用の可能性が検討されている。また、線虫において、変異体の解析から、ADAMTS分子が臓器形成、特に性腺の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている (Blelloch R. et al., Nature, 399, 586-590, 1999)。

このように、ADAMTS分子は多彩な生理機能を有することが強く示唆され、その機能の制御剤もしくは蛋白自体の医薬品応用の可能性も高いと期待される状況にあった。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、創薬標的分子としての可能性が非常に高い新規ADAMTS蛋白をコードする遺伝子を単離・同定し、それらの発現生産系を構築し、組換え蛋白を提供することを目的とする。

#### 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、上記ADAMTSファミリーに分類される新規蛋白をコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、組み換え蛋白の生産を可能にすることに成功した。

さらにまた、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同新規蛋白の製造法を確立した。これにより、該蛋白のプロテアーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニングを可能にし、本発明を完成した。

加えて、該蛋白はプロテアーゼ活性のうちの1つである細胞外基質アグリカンをGlu373-Ala374の間で選択的に切断する活性、すなわちアグリカナーゼ活性を有することを見いだし、このことより該蛋白及び該蛋白の活性を有意に修飾する化合物の医薬品としての可能性が示唆された。

## 【0007】

即ち本発明は、

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ、

(2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ、

(3) (1) 又は (2) 記載の金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子、

(4) (3) 記載の遺伝子を含むベクター、

(5) (4) 記載のベクターを含む宿主細胞、

(6) (5) 記載の宿主細胞を用いる (1) 又は (2) の金属プロテアーゼの製造方法、

(7) (1) 又は (2) 記載の金属プロテアーゼに対する抗体、  
に関する。

## 【0008】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「金属プロテアーゼ」は、亜鉛コンセンサス配列(HEx-xH)を有し、プロテアーゼ活性を有する「金属プロテアーゼ」を意味する。また、「プロテアーゼ」は断りがない限り、「蛋白」を表す。

本発明の新規金属プロテアーゼは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼならいざれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物」とは、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼである。「金属プロテアーゼの同効物」として好ましくは、SNPなどのアミノ酸置換で生じた該金属プロテアーゼを示す。

本発明の新規金属プロテアーゼとして好ましくは配列番号1若しくは3記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、特に配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

## 【0009】

また、本発明の新規金属プロテアーゼをコードする遺伝子は、上記の金属プロテアーゼをコードする塩基配列を含む遺伝子、即ち、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列で示される金属プロテアーゼ、又は該金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ遺伝子ならいざれでもよい。

本発明の新規金属プロテアーゼをコードする遺伝子として好ましくは、配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番若しくは1番から2850番、配列番号4記載の塩基配列の1番から1959番若しくは1番から5805番を有する遺伝子であり、特に好ましくは配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番、配列番号4記載の塩基配列の1番から1959番を有する遺伝子である。

本発明の新規金属プロテアーゼはさまざまなプロテアーゼ活性を有しているが、その中の1つであるアグリカナーゼ活性を有する点が特に注目すべき点である。

#### 【0010】

ここで、本発明の新規蛋白をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白の製造方法、本発明の新規蛋白の活性を検出する方法、本発明の新規蛋白に反応する抗体の製造方法、本発明の新規蛋白の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法を以下の1)～7)に記載する。

##### 1) 新規蛋白遺伝子の製造方法

###### a) 第1製造法-PCRを用いた方法

本発明の新規蛋白を產生する能力を有するヒト細胞あるいは組織からmRNAを抽出する。次いでこのmRNAを鑄型として該新規蛋白mRNAまたは一部のmRNA領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。denature温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号1又は3で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白のそれに適した逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（以下RT-PCRという）を行うことにより、該新規蛋白の全長cDNAまたはその一部を得ることができる。もしくは

、本発明の新規蛋白を產生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から調製したmRNAから逆転写酵素により作製したcDNAあるいは市販の該ヒト細胞あるいは組織由来のcDNAを鑄型とした、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCRという）を行うことにより、該新規蛋白の全長cDNAまたはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規蛋白の全長cDNAまたはその一部を適當な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該新規蛋白を製造することができる。

まず、本発明の新規蛋白の產生能力を有する細胞あるいは組織から該プロテアーゼをコードするものを包含するmRNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート・グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該プロテアーゼの產生能力を有する細胞あるいは組織は、該プロテアーゼをコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンプロッティング法、該プロテアーゼに特異的な抗体を用いたウエスタンプロッティング法などにより特定することができる。

mRNAの精製は常法に従えばよく、例えばmRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAをさらに分画することもできる。また、mRNAを抽出せずとも、市販されている抽出精製済みのmRNAを用いても良い。

次に、精製されたmRNAをランダムプライマー、オリゴdTプライマーまたはカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてPCRに供し、目的とする新規蛋白DNAを増幅する。また、cDNAを合成せずとも、市販のcDNAを用いてもよい。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

#### 【0011】

##### b) 第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法の他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造す

ることもできる。まず、前述の方法で得たmRNAを鑄型として逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としてはS1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. et al., Cell, 7, 279-288, 1976)、Land法(Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、Okayama-Berg法(Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982)などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えばDH5 $\alpha$ 株、HB101株、JM109株等に導入して形質転換させて、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として組換体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合にはHanahanの方法(Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわちCaCl<sub>2</sub>やMgCl<sub>2</sub>またはRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNA体を加える方法により実施することができる。もちろん、市販のコンピテント細胞を使用しても構わない。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規蛋白のDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

#### 【0012】

##### ① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ(<sup>32</sup>P又は<sup>33</sup>Pで標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。

##### ② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマ

ーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saki, R. K. et al., *Science* 239, 487-491, 1988)を行い、目的の新規蛋白の全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鑄型DNAとしては、該新規蛋白を产生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNAを断片を<sup>32</sup>P又は<sup>33</sup>Pで標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

#### ③ 他の動物細胞で新規蛋白を产生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞外に产生させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて該新規蛋白を検出することにより、元の形質転換株より目的の新規蛋白をコードするcDNAを有する株を選択する。

#### ④ 本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNAを発現ベクターに組込み、形質転換株の培養上清、細胞内もしくは細胞表面に蛋白を产生させ、本発明の新規蛋白に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用いて、所望の新規蛋白产生株を検出し、目的の株を選択する。

#### ⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にプロットし本発明の新規蛋白产生細胞からのmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の新規蛋白をコードするDNAを採取する方法は、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory

Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マニュアルに従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

## 【0013】

## c) 第3製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機〔例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など〕を用いて合成することができる。

## 【0014】

## d) 第4製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、新規蛋白の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al., *Nature*, 10, 105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al., *Nucleic Acids Res.*, 9, r43-r74, 1981)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis) (Mark, D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5662-5666, 1984)等に従うことができる。

## 【0015】

以上、a) 乃至d) により得られるDNAの配列決定は、例えばマキサム-ギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980)やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269-276, 1982)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白は、下記の方法によって得ることができる。

2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白の組み換え蛋白の

## 製造方法

単離された本発明の新規蛋白をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクター-DNAに再び組込むことにより、真核生物および原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. Cell, 23, 175-182, 1981)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urbaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞にEpstein Barr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) 等がよく用いられるが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dh fr (Subramani, S., et al. Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトのelongation factorプロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4(Invitrogen社製) 等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、pCDM8(Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-D

NA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J.,, *Virology*, 52, 456-457, 1973)、FuGENE<sup>TM</sup>6 Transfection Reagent(Boeringer Mannheim社製)を用いた方法、および電気パスル穿孔法(Neumann, E. et al.,, *EMBO J.*, 1, 841-845, 1982)等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

#### 【0016】

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P., J., *Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341, 1982)等をコ・ransfectし、G418耐性のコロニーを選択することにより新規蛋白を安定に产生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4(Invitrogen社製)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞外に本発明の新規蛋白が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞の細胞外に生産される本発明の新規蛋白は、該新規蛋白の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該新規蛋白を含む培養液を通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィ

一、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の新規蛋白はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該新規蛋白の発現の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。また、マーカー配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切斷除去する事が可能である。

### 【0017】

#### 3) 本発明の新規蛋白の金属プロテアーゼ活性を検出する方法

本発明の新規蛋白およびその部分ペプチドのプロテアーゼ活性は、本発明の新規蛋白およびその部分ペプチドと以下に挙げる基質とを適当な緩衝液中で混合し、反応させた後、それぞれの基質にあった方法で検出することができる。

基質としては、蛍光若しくは放射線標識の基質、蛍光団、消光団若しくは発色団を有する合成基質、および非標識の基質等が挙げられる。蛍光若しくは放射線標識の基質としては、蛍光若しくは放射線標識されたゼラチン、コラーゲンや合成ペプチド等、蛍光団を有する合成基質としては、Glt-Ala-Ala-Phe-MCA、Lys-MCA、Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA等(ペプチド研究所)、消光団を有する合成基質としては、MOCAC-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met(Dnp)-NH<sub>2</sub>、MOCAC-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dpn)-NH<sub>2</sub>等(ペプチド研究所)、発色団を有する合成基質としては、Ala-pNA、Bz-Tyr-pNA、Pyr-Phe-Leu-pNA等(ペプチド研究所)、非標識の基質としては、カゼイン、コラーゲン、フィブロネクチン、アグリカン、ゼラチン等の蛋白、インスリン等の生理活性ペプチドや合成ペプチド等が挙げられる。合成ペプチドとは非天然型アミノ酸を含むものも含有する。

たとえば、放射線標識した基質や蛍光団、消光団、発色団を有する基質を用いる場合は、液体シンチレーションカウンター、蛍光検出器、分光光度計等、適当な検出器を用いることにより、プロテアーゼ活性を検出することができる。非標識の基質を用いる場合は、SDS-PAGE、HPLC、Zymography等で分解物を判別でき、

プロテアーゼ活性を検出することができる。

【0018】

4) アグリカナーゼ活性を検出する方法

アグリカナーゼ活性を検出するための基質としては、ヒトもしくは他の動物の軟骨・組織より精製したアグリカン、あるいは遺伝子組換えアグリカン、市販のアグリカン（生化学工業）、もしくはそれらの部分蛋白を用いることができる。これらの基質と被試験プロテアーゼを含む細胞・組織培養液、細胞・組織抽出液もしくは（部分）精製標品を反応させ、Glu373-Ala374の間で切断された断片を検出することによりアグリカナーゼ活性を測定することができる。Glu373-Ala374の間で切断された断片の検出には、常法に従い分解断片のN末端配列もしくはC末端配列を決定する手法や、より簡便にGlu373-Ala374の間で切断されることにより生じるC末端のNITGE、N末端のARGSVを特異的に認識する抗ネオエピトープ抗体（Hughes C. E. et al., Biochem J., 305, 799-804, 1995）を用いたELISAやウエスタンブロティング等の免疫学的手法を用いることができる。

【0019】

5) 本発明の新規蛋白に反応する抗体の作製方法

本発明の新規蛋白に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該新規蛋白や該新規蛋白の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明新規蛋白をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いてDNAワクチン法（Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996）によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュvantなどの適当なアジュvantに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアバタイト、プロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられ

る。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルス泰因の細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチングアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8.1U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレンギリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル最小必須培地、ダルベッコ修飾最小必須培地、RPMI-1640などの通常よく用いられているものに適宜10～30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株はHAT選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で数日間、あるいはプリスタンで前処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10～20日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab'、Fvを得ることができる。

さらには、本発明新規蛋白に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデラの方法 (Clackson, T. et al., *Nature*, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. et al., P

roc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) によりsingle chain FvやFabとして得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

## 【0020】

6) 本発明の新規蛋白の金属プロテアーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法

本発明のスクリーニング方法は、少なくとも前記1) 及び2) で示される製造法で調製された新規蛋白を用いて、該新規蛋白の生化学的な特性に応じた新規蛋白の金属プロテアーゼ活性の修飾の指標を測定する系に被験物質を添加し、該指標を測定する手段を含む。ここで、該測定系としては、公知の各種プロテアーゼ測定系 (鶴 大典・船津 勝編 生物化学実験法30 「蛋白質分解酵素I」 学会出版センター、1993、同31 「蛋白質分解酵素I」 学会出版センター、1993) を挙げることができ、該文献に記載された処理方法に従い、あるいは準じて、あるいは応用して実施することにより被験物質のスクリーニングを行うことができる。

被験物質としては従来金属プロテアーゼ阻害活性を有することは知られているが該新規蛋白の金属プロテアーゼ活性に対して修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいはケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いる。

本発明の新規蛋白のプロテアーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニングには、本発明の新規蛋白またはその部分ペプチドの基質となるも

のであればいずれのものでも使用可能であり、好ましくは前記3)に記載の基質である。

#### 【0021】

7) 本発明の新規蛋白のアグリカナーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法

4) に示したアグリカナーゼ活性の検出法と同様の方法でスクリーニングが可能である。また、本発明の新規蛋白と反応させることにより分解され消滅・減少する添加したアグリカン、組換えアグリカン、市販のアグリカン、もしくはそれらの部分蛋白量を、アグリカナーゼで切断される部位のN側およびC側部分のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて計測するELISAなどの方法を用いることができる。さらには、本発明の新規蛋白と実施例10-1に示したN末にFLAGタグ、C末にHisタグが付加した組換えアグリカンを反応させて分解され消滅・減少する添加した組換えアグリカン量を抗FLAGタグ、抗HISタグ抗体を用いたELISA等で計測する方法が用いられる。この場合のタグはFLAGタグおよびHisタグに限定されず、また、組換えアグリカンは実施例10-1に限定されず、本蛋白によりアグリカナーゼ切断部位で切断されるアグリカンの部分蛋白もしくは改変蛋白であればよい。アグリカナーゼ活性に用いる被験物質は、6)の金属プロテアーゼ活性で用いる被験物質と同様の物質が用いられる。

#### 【0022】

本発明には、新規蛋白または前記スクリーニング法により選択された新規蛋白の活性を有意に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬が含まれる。

本発明の新規蛋白、新規蛋白の活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体または抗体断片を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注、関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドに

あっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

#### 【0023】

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

#### 【0024】

##### 【実施例】

以下、本発明を更に具体的に説明する。

特に断りのない限り、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning -A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝

子操作実験マニュアルに従ったが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0025】

(実施例1) 新規ADAMTS遺伝子MDTS6、MDTS7の部分配列の発見

ヒト脳由来cDNAライブラリーは文献 (Ohara O. et al., DNA Res., 4, 53-59, 1997) に示すように挿入配列の大きさによって厳密に分画されたものを構築した。これらのサプライブラリーのcDNA断片のサイズ分布は3kb - 8kbである。このライブラリーを構成するクローンの5'-及び3'-末端の配列を解読し、自家製のESTデータバンクを構築した。この中から、MDTS6、MDTS7の部分配列を得た。

【0026】

(実施例2) MDTS6の全長ORF配列の決定

MDTS6のcDNAクローンの配列を決定することにより、配列番号2の832番から2853番の配列を得た。配列番号2の1番から831番の配列は、Clontech社のヒト脳およびヒト胎盤のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNAを鋳型、LA-Taq<sup>TM</sup> (宝酒造社製) をDNAポリメラーゼとして、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を繰り返すことにより取得した。その結果、MDTS6は、配列番号1に示すように、TSP-1繰り返し配列を3個有し、950アミノ酸からなる新規ヒトADAMTS分子であることが判明した。

【0027】

(実施例3) MDTS7の全長ORF配列の決定

MDTS7のcDNAクローン2種の配列を決定することにより、配列番号4の1945番から5808番の配列を得た。配列番号4の1番から1944番の配列は、実施例2同様、RACEと塩基配列の解析を繰り返すことにより取得した。その結果、MDTS7は、配列番号3に示すように、TSP-1繰り返し配列を15個有し、1935アミノ酸からなる新規ヒトADAMTS分子であることが判明した。

【0028】

(実施例4) C末FLAG付加型発現ベクターの作製

pCEP4 (Invitrogen社製) を制限酵素ClaI、NsiIで切断し、平滑末端化後、自己連結反応を行い、EBNA1発現ユニットを除去した発現ベクターpCEP4dを作製した。このベクターを制限酵素NheI、BamHIで切断し、アガロースゲル抽出した約7.7Kbaの断片に、配列番号5で示される核酸と配列番号6で示される核酸をアニー

ルさせた重鎖オリゴヌクレオチドを挿入して、目的の配列を有するクローンを選択し、pCEP4d-FLAGと命名した。このベクターを鑄型、配列番号7で示されるオリゴDNA、配列番号8で示されるオリゴDNAをプライマーとして、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行った。生じた約0.4kbpのDNA断片を制限酵素SpeIで切断し、XbaIで切断したpCEP4d-FLAG（約7.7Kbp）に挿入し、目的通りプロモーターよりクローニングサイトのXbaI、NheI、NotI、BamHI認識配列そしてFLAGタグという順になっているクローンを選択して、pCEP4dE2-FLAGを完成した。

#### 【0029】

##### （実施例5）MDTS6短長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から583番（MDTS6短長蛋白に相当する部分）をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1番から1749番の遺伝子をPCRにより取得した。配列番号9と配列番号10で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNAを鑄型、LA-Taq<sup>TM</sup>（宝酒造社製）をDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを10回行った。この反応液を50倍希釈したDNA溶液を鑄型として、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼを用い、94℃2分の後、98℃10秒、66℃30秒、74℃4分のサイクルを40回、続いて72℃10分の条件でPCRを行った。こうして生成した5'側にXbaI認識配列およびKozak配列を、3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認した後、制限酵素XbaI、NotIで切断し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS6TSP1-FLAGを完成した。

#### 【0030】

##### （実施例6）MDTS6全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から950番をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1534番から2850番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、配列番号11と配列番号12で示されるオリゴDNAをプライマー、ESTクローンのプラスミドDNAを鑄型、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、50℃15秒、72℃2分のサイクルを20回、続いて72℃7分の

反応を行った。こうして生成した3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認し、pCRB-MDTS6-3Hとした。

配列番号2の1566番から1571番にBamHI認識配列があることを利用し、pCEP-MDT S6TSP1-FLAGを制限酵素XbaI、BamHIで切断して生じた約1.6kbpのDNA断片と、PCR B-MDTS6-3HをBamHI、NotIで切断して生じた約1.3kbpのDNA断片を連結し、pCEP4d E2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS6F-FLAGを完成した。

### 【0031】

#### (実施例7) MDTS7短長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号3の1番から653番(MDTS7短長蛋白に相当する部分)をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号4の1番から1959番の遺伝子をPCRにより取得した。配列番号13と配列番号14で示されるオリゴDNAをプライマーとし、実施例5に示す条件でPCRを行った。この際、配列番号4の971番から1054番を欠くバリエントがあることが判明した(図1～図3に示すMDTS7(d)は、MDTS7短長蛋白の該バリエントが欠如した蛋白を示す。)。こうして生成した5'側にXbaI認識配列およびKozak配列を、3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認した後、制限酵素XbaI、NotIで切断し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS7TSP1-FLAGを完成した。

### 【0032】

#### (実施例8) MDTS7全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から1935番をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1734番から3830番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、配列番号15と配列番号16で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNAを錆型、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを40回、続いて68℃7分の反応を行った。同様にして、配列番号2の3769番から5805番の遺伝子を、配列番号17と配列番号18で示されるオリゴDNAをプライマーとしたPCRにより取得した。こうして生成した2遺伝子断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認し、それぞ

れpCRB-MDTS7-3H1、pCRB-MDTS7-3H2とした。

配列番号2の1765番から1770番にBamHI認識配列、3797番から3802番にHincII認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS7TSP1-FLAGを制限酵素XbaI、BamHIで切断して生じた約1.8kbpのDNA断片と、pCRB-MDTS6-3H1をBamHI、HincIIで切断して生じた約2.0kbpのDNA断片、pCRB-MDTS6-3H2をHincII、NotIで切断して生じた約2.0kbpのDNA断片を連結し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS7F-FLAGを完成した。

### 【0033】

#### (実施例9) MDTS6短長蛋白、MDTS7短長蛋白の動物細胞株での発現

MDTS6短長蛋白、MDTS7短長蛋白いずれに関しても、(実施例5~8)においてpCEP4dE2-FLAGを骨格として作製した発現プラスミドをFuGENE<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim社製) を用いて添付指示書に従いHEK293-EBNA細胞 (invirogen社製) に導入した。プラスミド導入後、1-2日間培養して得た培養上清中に目的蛋白が存在することを、C末端に付加したFLAGタグに対する抗体 (マウス抗FLAGモノクローナル抗体 (M2; Sigma社製) を用いたウエスタンプロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清をSDS/10%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社製) を用いて電気泳動後、プロッティング装置を用いてPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロックエース (大日本製薬社製) を添加してブロッキングした後、マウス抗FLAGモノクローナル抗体 (M2; Sigma社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体 (Zymed社製もしくはTAGO社製) を順次反応させた。または、ブロッキング後、ビオチン化M2抗体 (Sigma社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Amasham社製) を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンプロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて該蛋白の発現を確認した (図1)。また、MDTS6全長蛋白、MDTS7全長蛋白についても (実施例7)、(実施例8) で得られた発現プラスミドを用い、上記MDTS6短長蛋白等の蛋白発現と同様に得ることができる。

### 【0034】

#### (実施例10) 動物細胞を宿主に発現したMDTS6短長蛋白、MDTS7短長蛋白の酵素活

## 性の検出

## (実施例10-1) 組換えアグリカンG1G2の調製

報告されているヒトアグリカンの遺伝子配列 (Doege K, et al. Biochem Soc Trans., 18, 200-202, 1990) をもとに合成した配列番号19と配列番号20で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNAを鋳型、PyroB est<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94°C1分の後、98°C10秒、68°C2分のサイクルを40回、続いて68°C7分の反応を行った。生成したDNA断片を制限酵素BamHIで切断し、pCEP-SigFlaのBamHI部位に導入し、ヒトアグリカンの球状ドメイン1 (G1) -球状ドメイン2 (G2) のN末にFLAGタグ、C末にHisタグの付加した蛋白を発現するために用いる発現プラスミドpCEP-rAggを作製した。pCEP-SigFlaはpCEP4dのHidIII、XhoI部位に配列番号21と配列番号22で示されるオリゴDNAの二重鎖を導入したものであり、プロモーターの下流に、文献 (Guan X-M, et al., J. Biol. Chem. 267, 21995-21998, 1992) に示されたインフルエンザウィルスのhemagglutinin由来の分泌シグナル配列とFLAGタグ配列、続いて、BamHI認識配列を有する発現ベクターである。

pCEP-rAggをHEK293-EBNA細胞に導入し、3-7日培養して目的蛋白を発現、生産した。培養液上清からの目的蛋白の精製は、N末端にFLAGタグが付加していることを利用して、アフィニティ精製した。すなわち、培養上清をカラムに詰めたM2-agarose (Sigma社製) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH7.4)/150 mM NaCl (以下、TBSという) で洗浄した後、0.1M Gly-HCl (pH 3.0)で、溶出、分画し、直ちに1M Tris-HCl (pH 8.0)で中和した。

## 【0035】

## (実施例10-2) MDTs6短長蛋白、MDTs7短長蛋白の組換えアグリカンG1G2分解活性の検出

(実施例9)において、発現プラスミド導入後12-16時間で培地を無血清に置換した後、さらに32-36時間培養を継続し、培養上清を回収した。この培養上清と上記で調製した組換えアグリカンを混合し、37°Cで1夜反応させ、SDS-PAGE後、

(実施例9)に記載した方法で、PVDF膜に転写、ブロッキング後、抗Hisx6ポリクローナル抗体 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology社製)、西洋わさびペーオキ

シダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体（MBL社製）を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社製）を用いて組換えアグリカンを検出した。その結果、発現プラスミドのみを導入したコントロールではみられない組換えアグリカンの分解物が検出された（図2）。

### 【0036】

#### （実施例10-3）抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析

アグリカナーゼはアグリカンのGlu373-Ala374の間を選択的に切断する金属プロテアーゼである。この切断により生じたC側のネオエピトープを認識する抗体を常法に従い、Ala-Arg-Gly-Ser-Val-Val-Leu-Thr-Ala-Lys-Cysからなる合成ペプチドとKLHとのコンジュゲートをマウスに5回免疫を繰り返すことにより調製した。（実施例10-2）と同様に転写、ブロッキングしたPVDF膜とこの抗体を反応させ、続いて、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（Tago社製）と反応させた後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社製）を用いて検出した。その結果、MDTS6により生じた組換えアグリカンG1G2分解物が抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体と反応し、検出されたバンドの分子量は（実施例10-2）で検出された分解物の分子量と一致した（図3）。

### 【0037】

#### （実施例11）IL-1によるMDTS6 mRNAの発現誘導

マウス細胞株ATDC5はインスリン処理により軟骨様細胞へと分化することが知られている（Atsumi T. et al., Cell Differ. Dev. 30, 109-116, 1990）。I型コラーゲンコート6ウェルプレート（旭テクノグラス社製）にATDC5細胞を $4 \times 10^5$ /wellで蒔き、DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS培地で2日間培養した後、インスリン（終濃度30ng/ml）、50 μg/ml L-アスコルビン酸含有DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS培地に交換し5日培養を継続し、IL-1 $\beta$ （終濃度5ng/ml）を添加して0、1、2、4、8時間処理した。各処理群よりISOGEN（日本ジーン社製）を用いてtotal RNAを調製し、その1 μgを鑄型として、BcaBEST<sup>TM</sup> RNA PCR Kit（宝酒造社製）を用いRT-PCRを行った。逆転写反応は添付の指示書に従い、Oligo dT-Adaptor primerをプラ

イマーとして行い、PCRはMDTS6の3' 非翻訳領域の配列を基に合成した配列番号23および配列番号24で示されるオリゴDNAをプライマーとして、94℃2分の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃30秒のサイクルを40回、続いて72℃7分の反応を行った。反応液を1%アガロースにて電気泳動し、生成した約0.3kbpのバンドの濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNAはIL-1により一過性に発現誘導されることが判明した（図4）。同じtotal RNAを鑄型としてADAMTS4およびADAMTS11についても検討したが、ヒト関節軟骨での結果（Flannery C.R., et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999）同様、mRNAレベルでの発現誘導は認められなかった。

### 【0038】

#### 【発明の効果】

本発明で得られた新規な金属プロテアーゼは、プロテアーゼ活性を有することより、医薬、及び医薬として用いられる該プロテアーゼの活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該プロテアーゼ及び該プロテアーゼの活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片の医薬用途としては該新規蛋白活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患、例えば、癌、関節炎、変形性関節症などが挙げられる。また、本発明のプロテアーゼは、アグリカナーゼ活性を有することより、該プロテアーゼ及び該プロテアーゼの活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片の医薬用途としては該新規蛋白活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患の内、特に関節炎、変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は実施例9で得られた、ECLウエスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6短長蛋白（図中でMDTS6TSP1を示す）、MDTS7短長蛋白（図中でMDTS7TSP1を示す）の動物細胞株での発現結果を示す写真である。尚、ADMP1TSP1、ADMP2TSP1はそれぞれADAMTS4、ADAMTS11を示し、これら物質は（Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999; Abbaszade I., et al.,

J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) の文献 (以下「Tortorella文献」とする。) に記載の物質であり、該物質の配列、及び製造法は該文献に記載の通りである。

【図2】 図2は実施例10-2で得られた、ECLウエスタンプロッティング検出システムを用い、MDTS6短長蛋白（図中でMDTS6TSP1を示す）、MDTS7短長蛋白（図中でMDTS7TSP1を示す）の組換えアグリカン分解活性の検出結果を示す写真である。尚、ADMP1TSP1、ADMP2TSP1はそれぞれADAMTS4、ADAMTS11を示し、これら物質はTortorella文献に記載の物質をC末にFLAGを付加させた蛋白としてHEK293EBNA細胞で発現させたものである。該物質の配列、及び製造法は該文献に記載の通りである。

【図3】 図3は実施例10-3で得られた、ウエスタンプロッティング検出システムを用い、MDTS6短長蛋白（図中でMDTS6TSP1を示す）及びMDTS7短長蛋白（図中でMDTS7TSP1を示す）の抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析結果を示す写真である。尚、ADMP1TSP1、ADMP2TSP1はそれぞれADAMTS4、ADAMTS11を示し、これら物質はTortorella文献に記載の物質であり、該物質の配列、及び製造法は該文献に記載の通りである。

【図4】 図4は実施例11で得られた、IL-1によるMDTS6、ADAMTS4、ADAMTS11の各mRNAの発現誘導の有無を確認した結果を示す電気泳動パターン写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> 新規な金属プロテアーゼ

<130> WP30552913

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1

5

10

15

Gly Gly Ser Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp

20

25

30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35

40

45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50

55

60

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser

65

70

75

80

Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly Leu Thr Gly Gly Ser Ser  
 85 90 95  
 Asp Leu Arg Arg Cys Phe Tyr Ser Gly Asp Val Asn Ala Glu Pro Asp  
 100 105 110  
 Ser Phe Ala Ala Val Ser Leu Cys Gly Gly Leu Arg Gly Ala Phe Gly  
 115 120 125  
 Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ile Ser Pro Leu Pro Asn Ala Ser Ala  
 130 135 140  
 Pro Ala Ala Gln Arg Asn Ser Gln Gly Ala His Leu Leu Gln Arg Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Val Pro Gly Gly Pro Ser Gly Asp Pro Thr Ser Arg Cys Gly Val  
 165 170 175  
 Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg Ala Leu Asp Pro Tyr Lys  
 180 185 190  
 Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg Ser Arg Arg Ser Gly  
 195 200 205  
 Arg Ala Lys Arg Phe Val Ser Ile Pro Arg Tyr Val Glu Thr Leu Val  
 210 215 220  
 Val Ala Asp Glu Ser Met Val Lys Phe His Gly Ala Asp Leu Glu His  
 225 230 235 240  
 Tyr Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Ala Ala Arg Leu Tyr Arg His Pro  
 245 250 255  
 Ser Ile Leu Asn Pro Ile Asn Ile Val Val Val Lys Val Leu Leu Leu  
 260 265 270  
 Arg Asp Arg Asp Ser Gly Pro Lys Val Thr Gly Asn Ala Ala Leu Thr  
 275 280 285  
 Leu Arg Asn Phe Cys Ala Trp Gln Lys Lys Leu Asn Lys Val Ser Asp  
 290 295 300  
 Lys His Pro Glu Tyr Trp Asp Thr Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp

305	310	315	320
Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly			
325	330	335	
Thr Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly			
340	345	350	
Leu Pro Ser Ala Phe Thr Thr Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn			
355	360	365	
Met Pro His Asp Asn Val Lys Val Cys Glu Glu Val Phe Gly Lys Leu			
370	375	380	
Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu Ile Gln Ile Asp Arg Ala			
385	390	395	400
Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile Ile Thr Asp Phe Leu Asp			
405	410	415	
Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln Pro Ser Lys Pro Ile Ser			
420	425	430	
Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Gln Cys			
435	440	445	
Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro Cys Pro Tyr Met Gln Tyr			
450	455	460	
Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala Lys Gly Gln Met Val Cys			
465	470	475	480
Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly			
485	490	495	
Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu Arg His Asn Leu Asn Lys			
500	505	510	
His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp Asp Pro Tyr Gly Pro Cys			
515	520	525	
Ser Arg Thr Cys Gly Gly Val Gln Leu Ala Arg Arg Gln Cys Thr			
530	535	540	

Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val  
 545 550 555 560  
 Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly  
 565 570 575  
 Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His  
 580 585 590  
 Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser  
 595 600 605  
 Gly Val Ser Pro Arg Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly  
 610 615 620  
 Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu  
 625 630 635 640  
 Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys  
 645 650 655  
 Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys  
 660 665 670  
 Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu  
 675 680 685  
 Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala  
 690 695 700  
 Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile  
 705 710 715 720  
 Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu  
 725 730 735  
 Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val  
 740 745 750  
 Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser  
 755 760 765  
 Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu

特平11-3217

770 775 780  
Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu  
785 790 795 800  
Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg  
805 810 815  
Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val  
820 825 830  
Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp  
835 840 845  
Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val  
850 855 860  
Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala  
865 870 875 880  
Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr  
885 890 895  
Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly  
900 905 910  
Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu  
915 920 925  
Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe  
930 935 940  
Cys Val Leu Arg Pro Cys  
945 950

<210> 2

<211> 2853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

atgcgtttgc tggcgtatcct aaccctggct ttcgcgggc gaaccgctgg aggctctgag 60  
 ccagagcggg aggttagtcgt tcccatccga ctggacccgg acattaacgg ccgcccgtac 120  
 tactggcggg gtcccgagga ctccgggat cagggactca ttttcagat cacagcattt 180  
 caggaggact tttacctaca cctgaccccg gatgctcagt tcttggctcc cgccctctcc 240  
 actgagcatc tggcggtccc cctccagggg ctcaccgggg gctttcaga cctgcgacgc 300  
 tgcttctatt ctggggacgt gaacgcccgg ccggactcgt tcgctgctgt gagcctgtgc 360  
 gggggctcc gcggagcctt tggctaccga ggcggcggat atgtcattag cccgctgccc 420  
 aaatgctagcg cgccggcggc gcagcgcaac agccagggcg cacacccctt ccagcggcgg 480  
 ggtgttccgg gcggggcttc cggagacccc acctctcgct gcggggtgcc ctcgggctgg 540  
 aaccccgcca tcctacggc cctggaccct tacaagccgc ggcggcggg cttcggggag 600  
 agtcgttagcc ggccgcaggc tggcgccgc aagcgtttcg tgtctatccc gcggtaacgtg 660  
 gagacgctgg tggtcgcgga cgagtcaatg gtcaagttcc acggcgcggg cctggaacat 720  
 tatctgctga cgctgctggc aacggcggcg cgactctacc gccatcccag catcctcaac 780  
 cccatcaaca tcgttgtggt caaggtgctg cttcttagag atcgtgactc cggggccaag 840  
 gtcacccggca atgcggccct gacgctgcgc aacttctgtg cctggcagaa gaagctgaac 900  
 aaagttagtg acaaggcaccc cgagtagctgg gacactgcca tcctcttcac caggcaggac 960  
 ctgtgtggag ccaccacctg tgacaccctg ggcattggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020  
 cccaagagaa gctgctctgt cattgaggac gatgggcttc catcagccctt caccactgcc 1080  
 cacgagctgg gccacgtgtt caacatgccc catgacaatg tgaaagtctg tgaggaggtg 1140  
 tttgggaagc tccgagccaa ccacatgatg tccccgaccc tcacccatcgat cgaccgtgcc 1200  
 aacccctggt cagcctgcag tgctgccatc atcaccgact tcctggacag cgggcacgg 1260  
 gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc ccgaggatct gccggggcggc 1320  
 agctacaccc tgagccagca gtgcgagctg gctttggcg tggctccaa gccctgtcct 1380  
 tacatgcagt actgcaccaa gctgtggtgc accgggaagg ccaagggaca gatggtgtgc 1440  
 cagacccggcc acttccctg ggccgatggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500  
 aaaggggcct gcgtggagag acacaaccc aacaaggcaca gggtgatgg ttcctgggcc 1560  
 aatgggatc cctatggccc ctgctgcgc acatgtggtg gggcgtgca gctggccagg 1620  
 aggcaatgcac ccaacccac ccctgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgagggtg 1680

aaataccat cctgcaacct ggagccctgc cccagctcag cctccggaaa gagcttccgg 1740  
 gaggagcagt gtgaggctt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctcgcc 1800  
 gtggcatggg tgcccaagta ctccggcgtg tctcccccggg acaagtgcaa gctcatctgc 1860  
 cgagccaatg gcactggcta ctttatgtg ctggcaccca aggtggtgga cggcacgctg 1920  
 tgctctcctg actccacctc cgtctgtgtc caaggcaagt gcatcaaggc tggctgtat 1980  
 gggAACCTgg gctccaagaa gagattcgac aagtgtgggg tgitgtgggg agacaataag 2040  
 agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagccatgc atggctacaa tttcgtgggt 2100  
 gccatccccg caggccctc aagcatcgac atccggcagc gcggttacaa agggctgatc 2160  
 gggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgct caacggcat 2220  
 ttcgtgggt cggcggtgga gcgggacctg gtggtaagg gcagtctgct gcggtacagc 2280  
 ggcacggca cagcggtgga gagcctgcag gcttccggc ccaatccigga gcccgtgacc 2340  
 gtggaggicc tciccggtgg gaagatgaca ccggcccccggg tccgctactc cttctatctg 2400  
 cccaaagagc ctcgggagga caagtccctc catcccaagg acccccccggg accctctgtc 2460  
 ttgcacaaca gcgtccctcag cctctccaaac caggtggagc agccggacga caggccccct 2520  
 gcacgctggg tggctggcag ctgggggccc tgctccgcga gctgcggcag tggcctgcag 2580  
 aagcggcgg tggactgccc gggctccgccc gggcagcgc cggccctgc ctgtgatgca 2640  
 gcccattccgc ccgtggagac acaaggctgc gggagccct gccccacctg ggagctcagc 2700  
 gcctggtcac cctgctccaa gagctgcggc cggggatttc agaggcgctc actcaagtgt 2760  
 gtggccacg gaggccggct gctggccccc gaccagtgca acttgcacccg caagccccag 2820  
 gagctggact tctgcgtcct gaggccgtgc tga 2853

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1935

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Met Gln Phe Val Ser Trp Ala Thr Leu Leu Thr Leu Leu Val Arg Asp

1

5

10

15

Leu Ala Glu Met Gly Ser Pro Asp Ala Ala Ala Val Arg Lys Asp  
 20 25 30  
 Arg Leu His Pro Arg Gln Val Lys Leu Leu Glu Thr Leu Ser Glu Tyr  
 35 40 45  
 Glu Ile Val Ser Pro Ile Arg Val Asn Ala Leu Gly Glu Pro Phe Pro  
 50 55 60  
 Thr Asn Val His Phe Lys Arg Thr Arg Arg Ser Ile Asn Ser Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Pro Trp Pro Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser  
 85 90 95  
 Gln Ala His Tyr Arg Leu Ser Ala Phe Gly Gln Gln Phe Leu Phe Asn  
 100 105 110  
 Leu Thr Ala Asn Ala Gly Phe Ile Ala Pro Leu Phe Thr Val Thr Leu  
 115 120 125  
 Leu Gly Thr Pro Gly Val Asn Gln Thr Lys Phe Tyr Ser Glu Glu Glu  
 130 135 140  
 Ala Glu Leu Lys His Cys Phe Tyr Lys Gly Tyr Val Asn Thr Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Glu His Thr Ala Val Ile Ser Leu Cys Ser Gly Met Leu Gly Thr Phe  
 165 170 175  
 Arg Ser His Asp Gly Asp Tyr Phe Ile Glu Pro Leu Gln Ser Met Asp  
 180 185 190  
 Glu Gln Glu Asp Glu Glu Gln Asn Lys Pro His Ile Ile Tyr Arg  
 195 200 205  
 Arg Ser Ala Pro Gln Arg Glu Pro Ser Thr Gly Arg His Ala Cys Asp  
 210 215 220  
 Thr Ser Glu His Lys Asn Arg His Ser Lys Asp Lys Lys Thr Arg  
 225 230 235 240  
 Ala Arg Lys Trp Gly Glu Arg Ile Asn Leu Ala Gly Asp Val Ala Ala

245	250	255
Leu Asn Ser Gly Leu Ala Thr Glu Ala Phe Ser Ala Tyr Gly Asn Lys		
260	265	270
Thr Asp Asn Thr Arg Glu Lys Arg Thr His Arg Arg Thr Lys Arg Phe		
275	280	285
Leu Ser Tyr Pro Arg Phe Val Glu Val Leu Val Val Ala Asp Asn Arg		
290	295	300
Met Val Ser Tyr His Gly Glu Asn Leu Gln His Tyr Ile Leu Thr Leu		
305	310	315
Met Ser Ile Val Ala Ser Ile Tyr Lys Asp Pro Ser Ile Gly Asn Leu		
325	330	335
Ile Asn Ile Val Ile Val Asn Leu Ile Val Ile His Asn Glu Gln Asp		
340	345	350
Gly Pro Ser Ile Ser Phe Asn Ala Gln Thr Thr Leu Lys Asn Phe Cys		
355	360	365
Gln Trp Gln His Ser Lys Asn Ser Pro Gly Gly Ile His His Asp Thr		
370	375	380
Ala Val Leu Leu Thr Arg Gln Asp Ile Cys Arg Ala His Asp Lys Cys		
385	390	395
Asp Thr Leu Gly Leu Ala Glu Leu Gly Thr Ile Cys Asp Pro Tyr Arg		
405	410	415
Ser Cys Ser Ile Ser Glu Asp Ser Gly Leu Ser Thr Ala Phe Thr Ile		
420	425	430
Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Asn Asn		
435	440	445
Lys Cys Lys Glu Glu Gly Val Lys Ser Pro Gln His Val Met Ala Pro		
450	455	460
Thr Leu Asn Phe Tyr Thr Asn Pro Trp Met Trp Ser Lys Cys Ser Arg		
465	470	475
		480

Lys Tyr Ile Thr Glu Phe Leu Asp Thr Gly Tyr Gly Glu Cys Leu Leu  
 485 490 495  
 Asn Glu Pro Glu Ser Arg Pro Tyr Pro Leu Pro Val Gln Leu Pro Gly  
 500 505 510  
 Ile Leu Tyr Asn Val Asn Lys Gln Cys Glu Leu Ile Phe Gly Pro Gly  
 515 520 525  
 Ser Gln Val Cys Pro Tyr Met Met Gln Cys Arg Arg Leu Trp Cys Asn  
 530 535 540  
 Asn Val Asn Gly Val His Lys Gly Cys Arg Thr Gln His Thr Pro Trp  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Gly Thr Glu Cys Glu Pro Gly Lys His Cys Lys Tyr Gly Phe  
 565 570 575  
 Cys Val Pro Lys Glu Met Asp Val Pro Val Thr Asp Gly Ser Trp Gly  
 580 585 590  
 Ser Trp Ser Pro Phe Gly Thr Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Ile  
 595 600 605  
 Lys Thr Ala Ile Arg Glu Cys Asn Arg Pro Glu Pro Lys Asn Gly Gly  
 610 615 620  
 Lys Tyr Cys Val Gly Arg Arg Met Lys Phe Lys Ser Cys Asn Thr Glu  
 625 630 635 640  
 Pro Cys Leu Lys Gln Lys Arg Asp Phe Arg Asp Glu Gln Cys Ala His  
 645 650 655  
 Phe Asp Gly Lys His Phe Asn Ile Asn Gly Leu Leu Pro Asn Val Arg  
 660 665 670  
 Trp Val Pro Lys Tyr Ser Gly Ile Leu Met Lys Asp Arg Cys Lys Leu  
 675 680 685  
 Phe Cys Arg Val Ala Gly Asn Thr Ala Tyr Tyr Gln Leu Arg Asp Arg  
 690 695 700  
 Val Ile Asp Gly Thr Pro Cys Gly Gln Asp Thr Asn Asp Ile Cys Val

705	710	715	720
Gln Gly Leu Cys Arg Gln Ala Gly Cys Asp His Val Leu Asn Ser Lys			
725	730	735	
Ala Arg Arg Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Ser Cys			
740	745	750	
Lys Thr Val Ala Gly Thr Phe Asn Thr Val His Tyr Gly Tyr Asn Thr			
755	760	765	
Val Val Arg Ile Pro Ala Gly Ala Thr Asn Ile Asp Val Arg Gln His			
770	775	780	
Ser Phe Ser Gly Glu Thr Asp Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Ser Ser			
785	790	795	800
Ser Lys Gly Glu Phe Leu Leu Asn Gly Asn Phe Val Val Thr Met Ala			
805	810	815	
Lys Arg Glu Ile Arg Ile Gly Asn Ala Val Val Glu Tyr Ser Gly Ser			
820	825	830	
Glu Thr Ala Val Glu Arg Ile Asn Ser Thr Asp Arg Ile Glu Gln Glu			
835	840	845	
Leu Leu Leu Gln Val Leu Ser Val Gly Lys Leu Tyr Asn Pro Asp Val			
850	855	860	
Arg Tyr Ser Phe Asn Ile Pro Ile Glu Asp Lys Pro Gln Gln Phe Tyr			
865	870	875	880
Trp Asn Ser His Gly Pro Trp Gln Ala Cys Ser Lys Pro Cys Gln Gly			
885	890	895	
Glu Arg Lys Arg Lys Leu Val Cys Thr Arg Glu Ser Asp Gln Leu Thr			
900	905	910	
Val Ser Asp Gln Arg Cys Asp Arg Leu Pro Gln Pro Gly His Ile Thr			
915	920	925	
Glu Pro Cys Gly Thr Asp Cys Asp Leu Arg Trp His Val Ala Ser Arg			
930	935	940	

Ser Glu Cys Ser Ala Gln Cys Gly Leu Gly Tyr Arg Thr Leu Asp Ile  
 945 950 955 960  
 Tyr Cys Ala Lys Tyr Ser Arg Leu Asp Gly Lys Thr Glu Lys Val Asp  
 965 970 975  
 Asp Gly Phe Cys Ser Ser His Pro Lys Pro Ser Asn Arg Glu Lys Cys  
 980 985 990  
 Ser Gly Glu Cys Asn Thr Gly Gly Trp Arg Tyr Ser Ala Trp Thr Glu  
 995 1000 1005  
 Cys Ser Lys Ser Cys Asp Gly Gly Thr Gln Arg Arg Arg Ala Ile Cys  
 1010 1015 1020  
 Val Asn Thr Arg Asn Asp Val Leu Asp Asp Ser Lys Cys Thr His Gln  
 1025 1030 1035 1040  
 Glu Lys Val Thr Ile Gln Arg Cys Ser Glu Phe Pro Cys Pro Gln Trp  
 1045 1050 1055  
 Lys Ser Gly Asp Trp Ser Glu Cys Leu Val Thr Cys Gly Lys Gly His  
 1060 1065 1070  
 Lys His Arg Gln Val Trp Cys Gln Phe Gly Glu Asp Arg Leu Asn Asp  
 1075 1080 1085  
 Arg Met Cys Asp Pro Glu Thr Lys Pro Thr Ser Met Gln Thr Cys Gln  
 1090 1095 1100  
 Gln Pro Glu Cys Ala Ser Trp Gln Ala Gly Pro Trp Gly Gln Cys Ser  
 1105 1110 1115 1120  
 Val Thr Cys Gly Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Ala Val Lys Cys Ile Ile  
 1125 1130 1135  
 Gly Thr Tyr Met Ser Val Val Asp Asp Asn Asp Cys Asn Ala Ala Thr  
 1140 1145 1150  
 Arg Pro Thr Asp Thr Gln Asp Cys Glu Leu Pro Ser Cys His Pro Pro  
 1155 1160 1165  
 Pro Ala Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser Thr Tyr Ser Ala Pro Arg Thr

1170	1175	1180
Gln Trp Arg Phe Gly Ser Trp Thr Pro Cys Ser Ala Thr Cys Gly Lys		
1185	1190	1195
Gly Thr Arg Met Arg Tyr Val Ser Cys Arg Asp Glu Asn Gly Ser Val		
1205	1210	1215
Ala Asp Glu Ser Ala Cys Ala Thr Leu Pro Arg Pro Val Ala Lys Glu		
1220	1225	1230
Glu Cys Ser Val Thr Pro Cys Gly Gln Trp Lys Ala Leu Asp Trp Ser		
1235	1240	1245
Ser Cys Ser Val Thr Cys Gly Gln Gly Arg Ala Thr Arg Gln Val Met		
1250	1255	1260
Cys Val Asn Tyr Ser Asp His Val Ile Asp Arg Ser Glu Cys Asp Gln		
1265	1270	1275
Asp Tyr Ile Pro Glu Thr Asp Gln Asp Cys Ser Met Ser Pro Cys Pro		
1285	1290	1295
Gln Arg Thr Pro Asp Ser Gly Leu Ala Gln His Pro Phe Gln Asn Glu		
1300	1305	1310
Asp Tyr Arg Pro Arg Ser Ala Ser Pro Ser Arg Thr His Val Leu Gly		
1315	1320	1325
Gly Asn Gln Trp Arg Thr Gly Pro Trp Gly Ala Cys Ser Ser Thr Cys		
1330	1335	1340
Ala Gly Gly Ser Gln Arg Arg Val Val Val Cys Gln Asp Glu Asn Gly		
1345	1350	1355
Tyr Thr Ala Asn Asp Cys Val Glu Arg Ile Lys Pro Asp Glu Gln Arg		
1365	1370	1375
Ala Cys Glu Ser Gly Pro Cys Pro Gln Trp Ala Tyr Gly Asn Trp Gly		
1380	1385	1390
Glu Cys Thr Lys Leu Cys Gly Gly Ile Arg Thr Arg Leu Val Val		
1395	1400	1405

Cys Gln Arg Ser Asn Gly Glu Arg Phe Pro Asp Leu Ser Cys Glu Ile  
 1410 1415 1420  
 Leu Asp Lys Pro Pro Asp Arg Glu Gln Cys Asn Thr His Ala Cys Pro  
 1425 1430 1435 1440  
 His Asp Ala Ala Trp Ser Thr Gly Pro Trp Ser Ser Cys Ser Val Ser  
 1445 1450 1455  
 Cys Gly Arg Gly His Lys Gln Arg Asn Val Tyr Cys Met Ala Lys Asp  
 1460 1465 1470  
 Gly Ser His Leu Glu Ser Asp Tyr Cys Lys His Leu Ala Lys Pro His  
 1475 1480 1485  
 Gly His Arg Lys Cys Arg Gly Gly Arg Cys Pro Lys Trp Lys Ala Gly  
 1490 1495 1500  
 Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Val Gln Gln Arg  
 1505 1510 1515 1520  
 His Val Gly Cys Gln Ile Gly Thr His Lys Ile Ala Arg Glu Thr Glu  
 1525 1530 1535  
 Cys Asn Pro Tyr Thr Arg Pro Glu Ser Glu Arg Asp Cys Gln Gly Pro  
 1540 1545 1550  
 Arg Cys Pro Leu Tyr Thr Trp Arg Ala Glu Glu Trp Gln Glu Cys Thr  
 1555 1560 1565  
 Lys Thr Cys Gly Glu Gly Ser Arg Tyr Arg Lys Val Val Cys Val Asp  
 1570 1575 1580  
 Asp Asn Lys Asn Glu Val His Gly Ala Arg Cys Asp Val Ser Lys Arg  
 1585 1590 1595 1600  
 Pro Val Asp Arg Glu Ser Cys Ser Leu Gln Pro Cys Glu Tyr Val Trp  
 1605 1610 1615  
 Ile Thr Gly Glu Trp Ser Glu Cys Ser Val Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
 1620 1625 1630  
 Lys Gln Arg Leu Val Ser Cys Ser Glu Ile Tyr Thr Gly Lys Glu Asn

1635	1640	1645
Tyr Glu Tyr Ser Tyr Gln Thr Thr Ile Asn Cys Pro Gly Thr Gln Pro		
1650	1655	1660
Pro Ser Val His Pro Cys Tyr Leu Arg Asp Cys Pro Val Ser Ala Thr		
1665	1670	1675
Trp Arg Val Gly Asn Trp Gly Ser Cys Ser Val Ser Cys Gly Val Gly		
1685	1690	1695
Val Met Gln Arg Ser Val Gln Cys Leu Thr Asn Glu Asp Gln Pro Ser		
1700	1705	1710
His Leu Cys His Thr Asp Leu Lys Pro Glu Glu Arg Lys Thr Cys Arg		
1715	1720	1725
Asn Val Tyr Asn Cys Glu Leu Pro Gln Asn Cys Lys Glu Val Lys Arg		
1730	1735	1740
Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asp Gly Glu Tyr Phe Leu Met Ile Arg Gly		
1745	1750	1755
Lys Leu Leu Lys Ile Phe Cys Ala Gly Met His Ser Asp His Pro Lys		
1765	1770	1775
Glu Tyr Val Thr Leu Val His Gly Asp Ser Glu Asn Phe Ser Glu Val		
1780	1785	1790
Tyr Gly His Arg Leu His Asn Pro Thr Glu Cys Pro Tyr Asn Gly Ser		
1795	1800	1805
Arg Arg Asp Asp Cys Gln Cys Arg Lys Asp Tyr Thr Ala Ala Gly Phe		
1810	1815	1820
Ser Ser Phe Gln Lys Ile Arg Ile Asp Leu Thr Ser Met Gln Ile Ile		
1825	1830	1835
Thr Thr Asp Leu Gln Phe Ala Arg Thr Ser Glu Gly His Pro Val Pro		
1845	1850	1855
Phe Ala Thr Ala Gly Asp Cys Tyr Ser Ala Ala Lys Cys Pro Gln Gly		
1860	1865	1870

Arg Phe Ser Ile Asn Leu Tyr Gly Thr Gly Leu Ser Leu Thr Glu Ser

1875

1880

1885

Ala Arg Trp Ile Ser Gln Gly Asn Tyr Ala Val Ser Asp Ile Lys Lys

1890

1895

1900

Ser Pro Asp Gly Thr Arg Val Val Gly Lys Cys Gly Gly Tyr Cys Gly

1905

1910

1915

1920

Lys Cys Thr Pro Ser Ser Gly Thr Gly Leu Glu Val Arg Val Leu

1925

1930

1935

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 5808

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

atgcagtttgcattcctggc cacactgcata acgcctcgtgg tgcgggacccgtggccgagatg 60  
 gggagcccaag acgcccggc ggccgtgcgc aaggacaggc tgcacccgag gcaagtgaaa 120  
 ttatttagaga ccctgagcga atacgaaatc gtgtctccca tccgagtgaa cgctctcgaa 180  
 gaaccctttc ccacgaacgt ccacttcaaa agaacgcgac ggagcattaa ctctgccact 240  
 gacccttggc ctgccttcgc ctccctcttc tccctctcta cctcctccca ggcgcattac 300  
 cgccctctcg ccttcggcca gcagtttcta ttatctca cgcctaattgc cggattttatc 360  
 gctccactgt tcactgtcac ctcctcggg acgcccgggg tgaatcagac caagtttatc 420  
 tccgaagagg aagcggaaact caagcactgt ttctacaaag gctatgtcaa taccaactcc 480  
 gagcacacgg ccgtcatcag cctctgctca ggaatgctgg gcacattccg gtctcatgtat 540  
 ggggattatt ttattgaacc actacagtct atggatgaac aagaagatga agaggaacaa 600  
 aacaaacccc acatcattta taggcgcagc gccccccaga gagagccctc aacaggaagg 660  
 catgcattgt acacccatcaga acacaaaaat aggcacagta aagacaagaa gaaaaccaga 720  
 gcaagaaaaat ggggagaaag gattaacctg gctggtgacg tagcagcatt aaacagcggc 780  
 ttagcaacag aggcattttc tgcttatgtt aataagacgg acaacacaag agaaaagagg 840

acccacagaa ggacaaaacg tttttatcc tatccacggt ttgtagaagt ctgggtggg 900  
 gcagacaaca gaatggtttc ataccatgga gaaaaccttc aacactataat ttaacttta 960  
 atgtcaattt tagcctctat ctataaagac ccaagtattt gaaatttaat taatattttt 1020  
 attgtgaact taatttgat tcataatgaa caggatgggc cttccatatac tttaatgct 1080  
 cagacaacat taaaaaactt ttgcgcgtgg cagcattcga agaacagtcc aggtggaatc 1140  
 catcatgata ctgctgttct cttacaaca caggatatac gcagagctca cgacaaatgt 1200  
 gataccttag gcctggctga actgggaacc atttgtgatc cctatagaag ctgttctatt 1260  
 agtgaagata gtggattttag tacagctttt acgatcgccc atgagctggg ccatgtgttt 1320  
 aacatgcctc atgatgacaa caacaaatgt aaagaagaag gagtttaagag tccccagcat 1380  
 gtcatggctc caacactgaa cttctacacc aacccttggta tgggtcaaa gtgttagtcga 1440  
 aaatataatca ctgagttttt agacacttgt tatggcgagt gtttgcttaa cgaacctgaa 1500  
 tccagaccct acccttgcct tttccaaactg ccaggcatcc tttacaacgt gaataaacaa 1560  
 tgtgaatttga tttttggacc aggttcttag gtgtgccat atatgtgca gtgcagacgg 1620  
 ctctggtgca ataacgtcaa tggagtacac aaaggctgcc ggactcagca cacaccctgg 1680  
 gccgatggga cggagtgcga gcctggaaag cactgcaagt atggattttg tttcccaa 1740  
 gaaatggatg tccccgtgac agatggatcc tggggagtt ggagtccctt tggAACCTGC 1800  
 tccagaacat gtggaggggg catcaaaaca gccattcggag agtgcacacag accagaacca 1860  
 aaaaatggtg gaaaataactg ttaggacgt agaatgaaat ttaagtccctg caacacggag 1920  
 ccatgtctca agcagaagcg agacttccga gatgaacagt gtgctactt tgacggaaag 1980  
 cattttaaca tcaacggtct gcttccaaat gtgcgtggg tccctaaata cagtggattt 2040  
 ctgatgaagg accgggtgcaa gttgttctgc agagtggcag ggaacacagc ctactatcg 2100  
 cttcgagaca gagtgataga tggaaactcct tgggtccagg acacaaatga tatctgtgtc 2160  
 cagggccctt gccggcaagc tggatgcgt catgtttaa actcaaaagc ccggagagat 2220  
 aatgtgggg tttgtgggtgg cgataattct tcatgcaaaa cagtggcagg aacatttaat 2280  
 acagtacatt atggttacaa tactgtggtc cgaattccag ctgggtctac caatatttgat 2340  
 gtgcggcagc acagtttctc aggggaaaca gacgatgaca actacttagc ttatcaagc 2400  
 agtaaagggtg aattcttgct aaatggaaac tttttgtca caatggccaa aagggaaatt 2460  
 cgcattggga atgctgtggt agagtacagt gggtccgaga ctgccgtaga aagaattaac 2520  
 tcaacagatc gcattgagca agaactttt cttcagggttt tgggtggg aaagttgtac 2580

aaccccgatg tacgttattc tttaatattt ccaattgaag ataaacctca gcagtttac 2640  
 tggAACAGTC atggccatg gcaagcatgc agtaaaccct gccaaaggga acggaaacga 2700  
 aaacttgtt gcaccaggga atctgatcg cttaactgttt ctgatcaaag atgcgatcg 2760  
 ctgccccagc ctggacacat tactgaaccc tgtggtacag actgtgacct gaggtggcat 2820  
 gttgccagca ggagtgaatg tagtgcacag tgtggcttgg gttaccgcac attggacatc 2880  
 tactgtgcca aatatagcag gctggatggg aagactgaga aggttcatga tggttttgc 2940  
 agcagccatc ccaaaccaggaa caaccgtgaa aaatgctcag gggaaatgtaa cacgggtggc 3000  
 tggcgctatt ctgcctggac tgaatgttca aaaagctgtg acggtgggac ccagaggaga 3060  
 agggctattt gtgtcaatac ccgaaatgtat gtactggatg acagcaaattt cacacatcaa 3120  
 gagaaagtta ccattcagag gtgcagttag ttcccttgc cacagtggaa atctggagac 3180  
 tggtcagagt gcttggcac cttggaaaa gggcataagc accggcaggt ctgggttcag 3240  
 tttggtgaag atcgattaaa tggatagaatg tggaccctg agaccaagcc aacatctatg 3300  
 cagacttgtc agcagccgga atgtgcattcc tggcaggcgg gtccctgggg acagtgcagt 3360  
 gtcacttgtc gacaggata ccagctaaga gcagtggaaat gcatcattgg gacttataatg 3420  
 tcagtggtag atgacaatga ctgtaatgca gcaactagac caactgatac ccaggactgt 3480  
 gaattaccat catgtcatcc tccccagct gccccggaaa cgaggagaag cacatacagt 3540  
 gcaccaagaa cccagtgccg atttgggtct tggacccat gctcagccac ttgtggaaaa 3600  
 ggtacccgga tgagatacgt cagctgcccga gatgagaatg gctctgtggc tgacgagagt 3660  
 gcctgtgcta ccctgcctag accagtggca aaggaagaat gttctgtgac accctgtggg 3720  
 caatggagg ccttggactg gagctttgc tctgtacccctt gggcaagg tagggcaacc 3780  
 cggcaagtga tgggtgtcaa ctacagtgcac cacgtgattt atcggagtga gtgtgaccag 3840  
 gattataatcc cagaaactga ccaggactgt tccatgtcac catgccccca aaggacccca 3900  
 gacagtggct tagctcagca ccccttccaa aatgaggact atcgtccccg gagcgccagc 3960  
 cccagccgca cccatgtgct cggtgaaaaac cagtggagaa ctggccctg gggagcatgt 4020  
 tccagttacccctt gtgctggcgg atcccagcgg cgtgttgc tatgtcagga tggaaatgg 4080  
 tacaccgcaa acgactgtgt ggagagaata aaacctgatg agcaaagagc ctgtgaatcc 4140  
 ggccttgc ctcagtggc ttatggcaac tggggagagt gcactaagct gtgtgggtgg 4200  
 ggcataagaa caagactggt ggtctgtcag cggtccaacg gtgaacgggtt tccagattt 4260  
 agctgtgaaa ttcttgataa acctcccgat cgtgaggcagt gtaacacaca tgcttgc 4320

cacgacgctg catggagtac tggcccttgg agctcggtt ctgtctcttgg 4380  
 cataaacaac gaaatgttta ctgcattggca aaagatggaa gccattttaga aagtgattac 4440  
 tggtaaggcacc tggcttaagcc acatgggcac agaaagtgcg gaggaggaag atgccccaaa 4500  
 tggaaagctg gcgcttggag tcagtgcctt gtgtcctgtg gccgaggcgt acagcagagg 4560  
 catgtggct gtcagatcgg aacacacaaa atagccagag agaccgagtg caacccatac 4620  
 accagaccgg agtcggaacg cgactgccaa ggcccacggt gtccctcta cacttggagg 4680  
 gcagaggaat ggcaagaatg caccaagacc tgccgcgaag gctccaggta ccgcaagggt 4740  
 gtgtgtgtgg atgacaacaa aaacgagggtg catggggcac gctgtgacgt gagcaagcgg 4800  
 ccgggtggacc gtgaaagctg tagtttgc当地 ccctgcgagt atgtctggat cacaggagaa 4860  
 tggtcagagt gctcagtgac ctgtggaaaa ggctacaaaac aaaggcttgc当地 ctcgtgc当地 4920  
 gagatttaca ccgggaagga gaattatgaa tacagctacc aaaccaccat caactgccc当地 4980  
 ggcacgc当地 cccccc当地 tacccctgt tacctgaggg actgccc当地 ctcggccacc 5040  
 tggagagttt gcaactgggg gagctgctca gtgtcttgg gtgttggaggat gatgcagaga 5100  
 tctgtcaat gtttaaccaa tgaggaccaa cccagccact tatgccacac tgatctgaag 5160  
 ccagaagaac gaaaaacctg ccgtaatgtc tataactgtg agttacccca gaattgcaag 5220  
 gaggtaaaaa gacttaaagg tgccagtgaa gatggtaat atttcctgtat gattagagga 5280  
 aagcttctga agatattctg tgcggggatg cactctgacc accccaaaga gtacgtgaca 5340  
 ctggtgcatg gagactctga gaatttctcc gaggtttatg ggcacagggtt acacaacccca 5400  
 acagaatgtc cctataacgg gagccggcgc gatgactgcc aatgtcgaa ggattacacg 5460  
 gccgctgggt ttccagttt tcagaaaatc agaatagacc tgaccagcat gcagataatc 5520  
 accactgact tacagtttgc aaggacaagc gaaggacatc ccgtccctt tgccacagcc 5580  
 ggggattgct acagcgctgc caagtgc当地 caggtcggtt ttagcatcaa cc当地ttagga 5640  
 accggcttgc当地 cttaactga atctgccaga tggatatcac aagggattt tgctgtct 5700  
 gacatcaaga agtcgccc当地 tggtaacc当地 gtcgtaggaa aatgcggtgg ttactgtgaa 5760  
 aaatgcactc catcctctgg tactggccctg gaggtgc当地 gag 5808

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctagcgcggc cgccaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa 50

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc 34

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ggactagtgt cgaccggta tggctgcgc 29

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gtgtctagag ccatgctttt gctgggcattc ctaaccctgg ct

42

●<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

agagcggccg cctgctccctc ccggaagctc tttccggagg c

41

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

aagcacaggg tggatggttc ctgggcc

27

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag

37

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

gtgtctagag ccatgcagtt tgtatcctgg gccacactgc ta

42

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

agagcggccg cctgttcatc tcggaagtct cgcttctgct t

41

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

tcccaaagaa atggatgtcc ccgtgac

27

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

tcactccgat caatcacgtg gtcactg

27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

ggtagggcaa cccggcaagt gatgtgt

27

<210> 18

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcgcggccgc taaaactcgc acctccaggc cagtacc

37

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

taggatcctt gtagaaactt cagaccatga caactcg

37

<210> 20

<211> 59

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

atggatcctc aatggtagatg gtatgtatga ccgaagcaga aggcatggtg ccggacag 59

<210> 21

<211> 97

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

agcttgccac catgaagacg atcatgccc ttagctacat cttctgcctg gtattgcgg 60

actacaagga cgatgtatgac aaggggatcc actagtc 97

<210> 22

<211> 97

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

tcgagactag tggatcccct tgtcatcatc gtcctttag tcggcgaata ccaggcagaa 60

gatgtatgatc agggcgatga tcgtcttcat ggtagca 97

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

acctcagcag ccagctccct tgtatacaca

30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

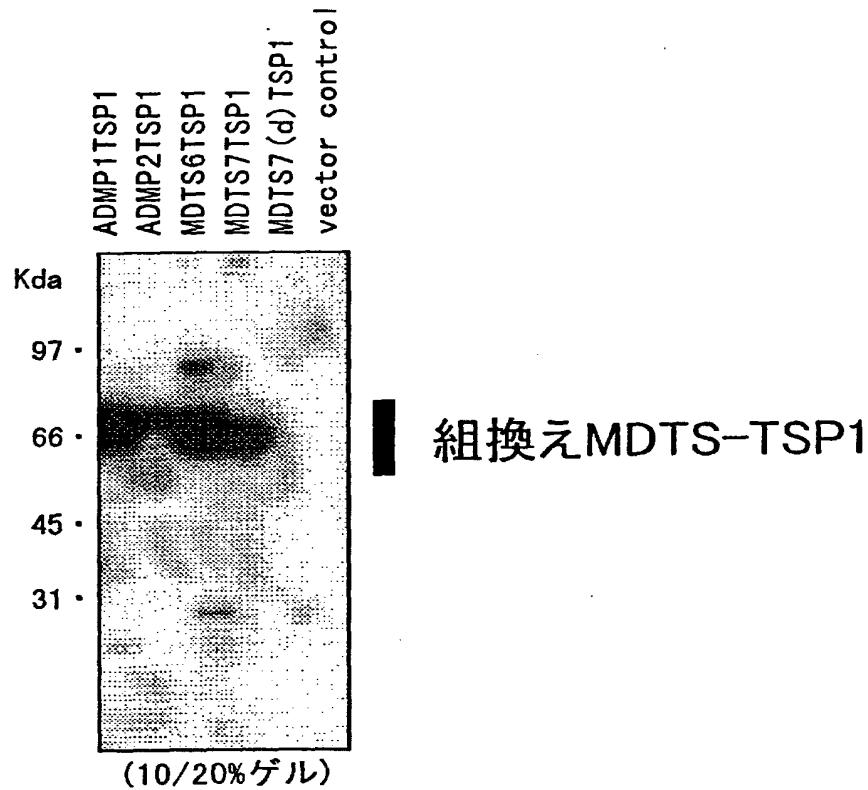
<400> 24

cttgaggggg atggaccaat acagctttgg

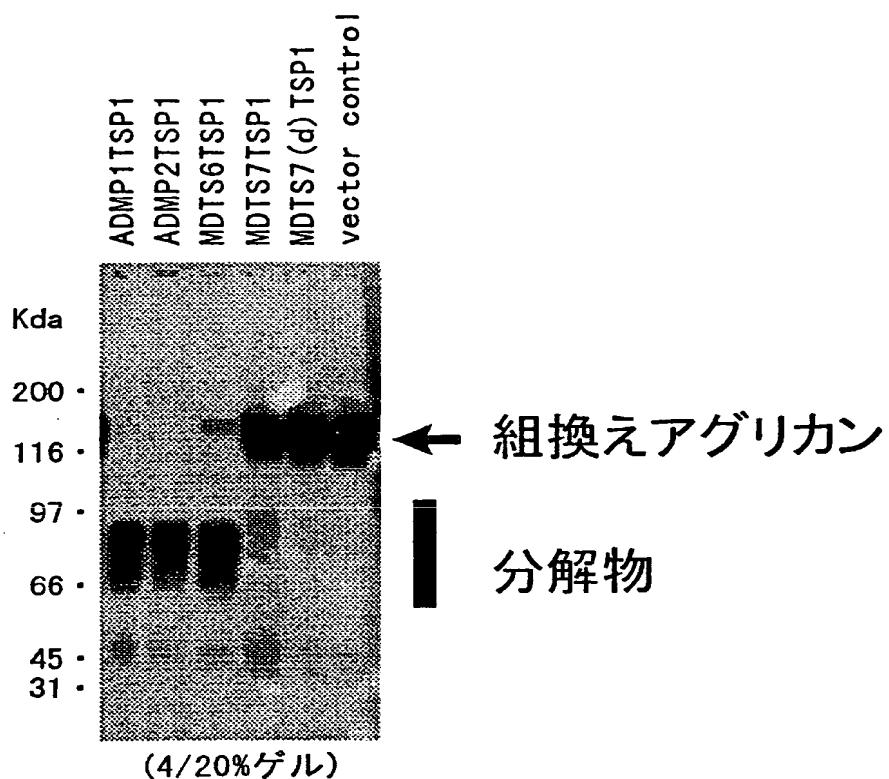
30

【書類名】 図面

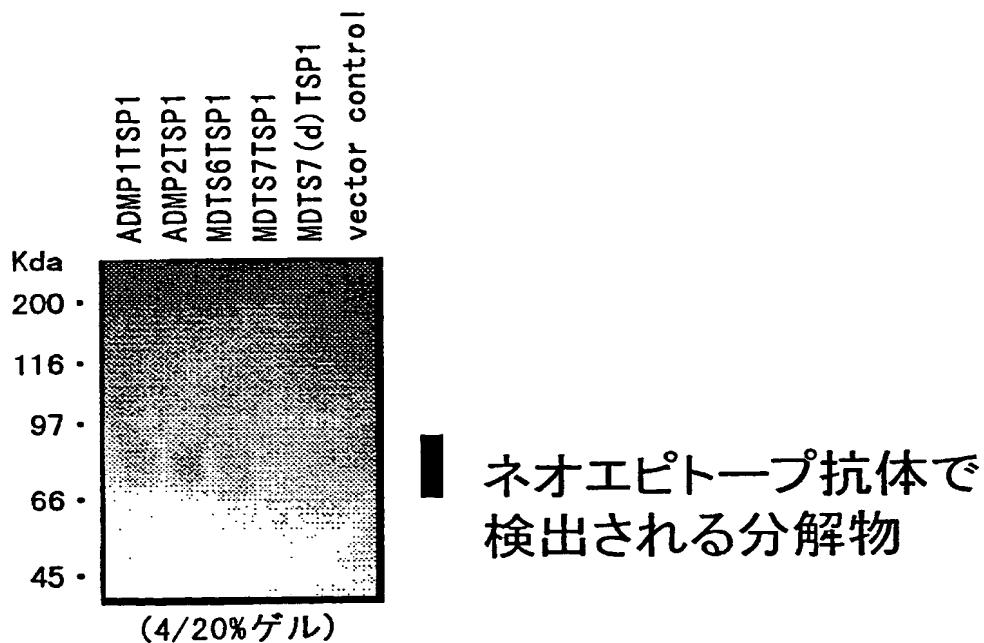
【図1】



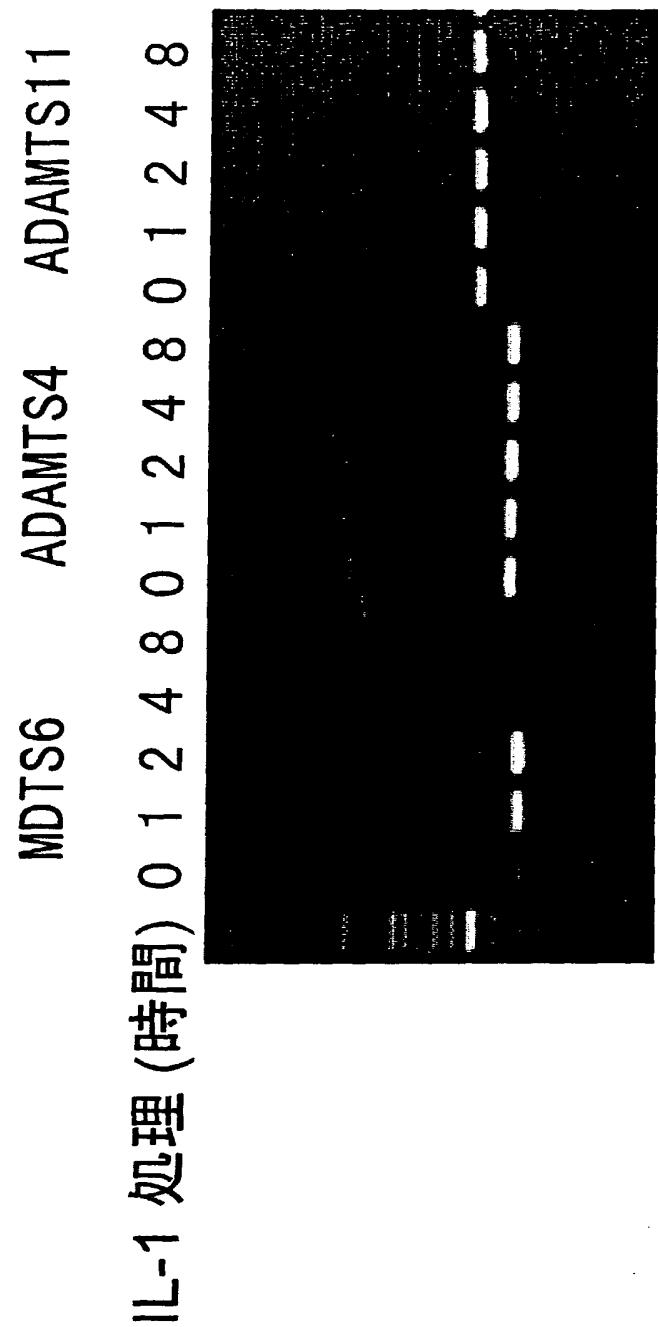
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 創薬標的分子としての可能性が非常に高い、新規ADAMTS蛋白をコードする遺伝子を単離・同定し、それらの活性を修飾する物質を探索するために必要な組換え蛋白の提供。

【解決手段】 ADAMTSファミリーに分類される新規蛋白をコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、該蛋白を発現させた。該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同蛋白の製造法、及び、該蛋白及び該蛋白の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング法を確立した。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第321740号
受付番号	59901106427
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成11年11月15日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000006677
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
【氏名又は名称】	山之内製薬株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】	596175810
【住所又は居所】	千葉県木更津市矢那1532-3
【氏名又は名称】	財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

## 【代理人】

【識別番号】	100088616
【住所又は居所】	東京都台東区浅草橋3丁目20番18号 第8菊星タワービル3階 渡邊一平国際特許事務所
【氏名又は名称】	渡邊 一平

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100089200
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	長井 省三

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100098501
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	森田 拓

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100109357
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	矢野 恵美子

次頁無

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成11年11月24日  
【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 平成11年特許願第321740号  
【補正をする者】  
【識別番号】 000006677  
【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社  
【補正をする者】  
【識別番号】 596175810  
【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所  
【代理人】  
【識別番号】 100088616  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 渡邊 一平  
【手続補正 1】  
【補正対象書類名】 特許願  
【補正対象項目名】 提出物件の目録  
【補正方法】 追加  
【補正の内容】  
【提出物件の目録】  
【物件名】 委任状 3

29922200132



## 委任状

平成11年10月29日

私は、識別番号 100088616 弁理士 渡邊 一平 氏を以って  
代理人として下記事項を委任します。

## 記

1. 発明の名称「新規な金属アロテアーゼ」の特許出願  
(整理番号: WP30552413)



に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定  
不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 月 日 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並び  
にその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並  
びに本件に関する上記事項一切。

4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、  
実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の  
下附を受けること。

5. 第1項及び第3項の出願に基づく特許権、実用新案権、意匠権又は商標権に関す  
る一切の件並びに本特許権、実用新案権、意匠権又は商標権の放棄。

6. 第1項及び第5項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ  
等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号

氏 名 山之内製薬株式会社  
代表者 小野田正愛



## 委任状

平成11年10月27日

私は、識別番号 100088616 弁理士 渡邊 一平 氏を以って  
代理人として下記事項を委任します。

記

1. 発明の名称「新規な金属プロテアーゼ」の特許出願  
(整理番号: WP30552913)

備

に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 月 号

に基づく特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の優先権主張並びにその取下げ。

- 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。
- 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。
- 第1項及び第3項の出願に基づく特許権、実用新案権、意匠権又は商標権に関する一切の件並びに本特許権、実用新案権、意匠権又は商標権の放棄。
- 第1項及び第5項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。
- 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。
- 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 千葉県木更津市矢部1532-3

氏 名 有限会社カザディー・エヌ・エー研究所 理事長 平 岩 外 四

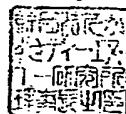


## 委 任 状

平成11年10月29日

私は、弁理士 長井 省三 氏(識別番号 10089200)、弁理士 森田 拓 氏(識別番号 10098501)、及び弁理士 矢野 恵美子 氏(識別番号 10109357) を以って  
代理人として、下記事項を委任します。

記



## 1.発明の名称 「新規な金属プロテアーゼ」の特許出願

(整理番号: WP 30552913)

に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2.上記出願に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並びにその取下げ。

3.上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。

4.上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。

5.第1項及び第3項の出願に基づく特許権、実用新案権、意匠権、又は商標権に関する一切の件並びに本特許権、実用新案権、意匠権又は商標権の放棄。

6.第1項及び第5項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7.上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8.上記事項を処理する為、後代理人を選任及び解任すること。

住所 千葉県木更津市矢那1532-3

氏名 財團法人かずさディー・エヌ・エー研究所 理事長 平 岩 外



認定・付加情報

特許出願の番号 平成11年 特許願 第321740号  
受付番号 29922200132  
書類名 手続補正書  
担当官 宇留間 久雄 7277  
作成日 平成12年 1月12日

＜認定情報・付加情報＞

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000006677]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号  
氏 名 山之内製薬株式会社

特平11-321740

出願人履歴情報

識別番号 [596175810]

1. 変更年月日 1996年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那1532-3

氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所